



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Offenlegungsschrift  
⑩ DE 195 15 891 A 1

⑤ Int. Cl.<sup>8</sup>:  
C 12 Q 1/68  
C 12 Q 1/04

⑲ Aktenzeichen: 195 15 891.1  
⑳ Anmeldetag: 29. 4. 95  
㉑ Offenlegungstag: 31. 10. 95

DE 195 15 891 A 1

⑦ Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦ Erfinder:  
Rofe, Arndt, Dr.med., 18055 Rostock, DE; Heidrich,  
Björn, Dr., 10783 Berlin, DE; Robinson,  
Peter-Nicholas, 10629 Berlin, DE; Tiecke, Frank,  
Dipl.-Bio.-Chem., 13057 Berlin, DE

⑧ Entgegenhaltungen:  
US 52 98 392  
US 48 10 644  
WO 94 28 174 A1  
WO 92 11 273 A1  
HEIDRICH, B. et al.: Med. Microbiol. Lett. 3, (1994)  
S. 279-290;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ⑤ Gattungs- und speziespezifische Identifizierung von Legionellen  
⑦ Verfahren zur gattungsspezifischen Amplifikation von Legionellen und gattungsspezifische und speziespezifische Identifizierung.

DE 195 15 891 A 1

## Beschreibung

Gegenstand der Erfindung sind Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella* und Verfahren zum gattungs- und speziesspezifischen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* sowie dafür geeigneter Reagenzien.

Legionellen sind aquatische, ubiquitäre gramnegative aerobe, fakultativ intrazelluläre stäbchenförmige Bakterien. Die Familie Legionellaceae besteht aus einer Gattung (*Legionella*) mit derzeit 48 bekannten Spezies und 51 Serogruppen. Von der wichtigsten Spezies *L. pneumophila* existieren 16 bekannte Serovare. Unter ihren wichtigsten Reservoiren sind Wasserleitungen, Klimaanlage und Kühltürme. Die Infektion des Menschen erfolgt über legionellenhaltige Aerosole. Die Legionellose tritt häufig als Epidemie, z. B. über Duschköpfe aus Warmwasseranlagen, kontaminiertes Kühlwasser in Klimaanlage, oder sporadisch auf. Eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung ist bisher nicht beschrieben.

Legionellen-Infektionen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Die Legionärskrankheit, eine akute, schwere, oft mit hohem Fieber, abdominellen Beschwerden, Kopfschmerzen, Myalgien und Verwirrheitszuständen und anderen neurologischen Symptomen einhergehende atypische Pneumonie sowie das Pontiac-Fieber, eine mit grippeähnlichen Symptomen verlaufende selbstlimitierende Variante der Legionellose.

Die wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila*, ist *L. pneumophila* Serogruppe 1 (*L. pn. Sero. 1*) als dem mit ca. 80% häufigsten Erreger der Legionärskrankheit. Es existieren aber große regionale Unterschiede, insbesondere bei den nosokomial erworbenen Legionellosen. Im Gegensatz dazu werden bei Pontiac-Fieber überwiegend *L. micdadei* und andere Non-Pneumophila-Spezies als kausales Agens beschrieben.

Die Labordiagnostik der Legionellen ist schwierig. Legionellen können nur schlecht mit Fuchsin angefärbt werden, so daß man die Erreger mit der Gram-Färbung praktisch nicht darstellen kann. Legionellen wachsen nicht auf üblichen Kulturmedien, sondern nur auf Spezialnährböden und einer Atmosphäre, die 2,5–5% CO<sub>2</sub> enthält. Die Sensitivität der Kultur ist nur ca. 20% für *L. pneumophila* und ca. 5% für andere Spezies.

Zum Nachweis von Legionellen wurden unter anderem DNS-DNS-Hybridisierungen, Pulsfeld-Elektrophorese, Ribotyping, Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Fettsäure- und Uclbinon-Analysen, rRNA-Sequenzierung, RT-PCR und Southern Blot, Latex-Agglutination, Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie, indirekte Immunfluoreszenz und Kohlenhydratutilisation (BIOLOG-System) angewandt.

In *Med. Microbiol. Lett.* 1994; 3: 279–290 und *Clin. Lab.* 1993; 40: 211–216 ist die Sequenzierung von 5S-rDNA von Legionellen beschrieben.

Auf dem Markt ist ein Kit zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben erhältlich. Bei einem Nachweisverfahren mit Hilfe dieses Kits wird in einem ersten Schritt ein Fragment der 5S-rDNA genuspezifisch amplifiziert. In demselben Gefäß wird ein Fragment des MIP-Gens der Spezies *L. pneumophila* amplifiziert. Der Kit enthält insgesamt 7 Primer zur Durchführung einer sogenannten Multiplex-PCR unter Herstellung zweier PCR-Amplifikate. Anschließend erfolgt die Detektion der Amplifikate durch Reverse Dot Blot. Das in diesem Kit realisierte Verfahren ist wegen der Notwendigkeit des Einsatzes einer großen Anzahl von Primern komplex und in der Herstellung aufwendig. Darüber hinaus ist das bekannte Verfahren im Hinblick auf die Sensitivität unbefriedigend.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher die Bereitstellung von Reagenzien, die den Nachweis von Legionellen einfacher gestalten und die weniger Komponenten beinhalten. Eine weitere Aufgabe war es, spezifischere und potentiell variabelere Legionellennachweise zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist daher in einem ersten Aspekt ein Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella*, in dem mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* amplifiziert werden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Nachweisverfahren unter Verwendung des oben genannten Amplifikationsverfahrens.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID. NO. 1 ist oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 ist.

Kern der Erfindung ist, daß Sequenzen auf dem *Legionella*-Genom lokalisiert wurden, die das Entwerfen von Nukleinsäuresonden erlauben, die zum Nachweis aller bislang den Legionellen zugeordneten Spezies der Gattung *Legionella* verwendet werden können.

Unter Amplifikation wird die Erhöhung der Konzentration der in einem Reaktionsgemisch vorhandenen Nukleinsäuren oder Teilen davon verstanden. Beispiele für solche Amplifikationsverfahren sind die Polymerase-Kettenreaktion gemäß EP-B-0 201 184, das sogenannten NASBA-Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 sowie davon abgeleitete Verfahren.

Bei dem Verfahren der EP-A-0 201 184 wird die zu amplifizierenden Nukleinsäure, die einzelsträngig gemacht wird, mit einem molaren Überschuß zweier Oligonukleotid-Primer unter Hybridisierungsbedingungen und in Gegenwart eines induzierenden Agens für die Polymerisation und Nukleotiden behandelt, wobei die Primer so gewählt werden, daß für jeden Strang ein zum Nukleinsäurestrang komplementäres Verlängerungsprodukt des betreffenden Primers synthetisiert wird, und daß ein Verlängerungsprodukt eines Primers, wenn es von seinem Komplement getrennt ist, als Matrice zur Synthese eines Verlängerungsprodukts des anderen Primers dienen kann. Trennen der Verlängerungsprodukte von den Matrizen, an denen sie synthetisiert wurden, und Verwendung der gebildeten Verlängerungsprodukte zur erneuten Umsetzung mit den Primern. Durch die zyklische Wiederholung der Schritte ergibt sich eine theoretisch exponentielle Vermehrung einer Nukleinsäuresequenz, die innerhalb der äußeren Hybridisierungsposition der Primer liegt.

Bei dem Verfahren gemäß EP-A-0 329 822 wird eine Primerkonstruktion zur Erzeugung einer doppelsträngi-

gen Nukleinsäure verwendet, in der die zu amplifizierende Nukleinsäuresequenz funktionell an einen Promotor gebunden ist. Hierzu weist einer der Primer mindestens einen Strang einer Promotorregion auf. Der intermediär gebildete Transkriptionskomplex wird Bedingungen unterworfen, unter denen unter der Kontrolle des Promotors Ribonukleinsäuren unter Verwendung der zu amplifizierenden Nukleinsäure als Matrize gebildet werden. Die gebildeten Ribonukleinsäuren werden erneut zur Bildung jeweils eines neuen transkribierbaren Nukleinsäurekomplexes verwendet. Ein Vorteil dieses Systems ist, daß es isotherm geführt werden kann.

Unter Multiplex-PCR wird ein Verfahren gemäß EP-A-0 364 255 verstanden. Nach diesem Verfahren werden in einer Eintopfreaktion durch geeignete Anordnung der Hybridisierungspositionen einer Vielzahl von Primern bestimmte Fragmente von Nukleinsäuren amplifiziert, die meist unterschiedliche Länge und Position im Genom aufweisen.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B. D. Hames und S. J. Higgins, IRL Press, 1986, insbesondere in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Edt. F. M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, insbesondere 2.9.1—2.9.10 und Molecular Cloning, Edt. J. Sambrook et al., CSH, 1989, insbesondere 9.4.7—9.5.8, Bezug genommen. Dazu gehören insbesondere die bekannten Methoden zur Herstellung von markierten Nukleosidtriphosphaten, wie sie auch in EP-A-0 329 474 beschrieben sind, die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden, die Spaltung von Nukleinsäuren mittels Restriktionsenzymen, die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt, sowie die Bildung von Nukleinsäuren aus Nukleosidtriphosphaten mit Hilfe von Polymerasen, gegebenenfalls unter Verwendung von sogenannten Primern.

Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise radioaktive ( $^{32}\text{P}$ ), farbige oder fluoreszierende Gruppen oder Metallatome. Indirekt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie Antikörper, Antigene, Haptene oder Enzyme oder enzymatisch aktive Teilenzyme. Diese werden in einer nachfolgenden Reaktion oder Reaktionssequenz detektiert. Besonders bevorzugt sind Haptene, da mit ihnen markierte Nukleosidtriphosphate (rNTP oder dNTP) im allgemeinen besonders gut als Substrate von (RNS- bzw. DNS-)Polymerasen einsetzbar sind und eine anschließende Reaktion mit einem markierten Antikörper gegen das Hapten oder das haptenisierte Nukleosid leicht vorgenommen werden kann. Solche Nukleosidtriphosphate sind beispielsweise Brom-Nukleosidtriphosphate oder Digoxigenin-, Digoxin- oder Fluorescein-gekoppelte Nukleosidtriphosphate. Als besonders geeignet haben sich die in EP-A-0 324 474 genannten Steroide und deren Detektion erwiesen. Für deren Inkorporation in Nukleinsäuren wird hiermit auf die EP-A-0 324 474 verwiesen.

Unter den Nukleinsäuren, die zur Verwendung des erfindungsgemäßen Amplifikations- und Nachweisverfahrens für Legionellen verwendet werden können, werden insbesondere genomische Nukleinsäuren verstanden. Genomische Nukleinsäuren enthalten unter anderem auch die Gene, welche für ribosomale RNS (rRNS) codieren, sowie eine Reihe von Spacersequenzen. Diese werden nach der Größe der rRNS, für die sie codieren, benannt. In Legionellengenomen sind in dieser Reihenfolge das 16S-rRNS-Gen, das 23S-rRNS-Gen und das 5S-rRNS-Gen angeordnet. Diese Gene sind durch sogenannte Spacerregionen voneinander getrennt.

SEQ.ID.NO. 1 offenbart eine Nukleotidsequenz, die Ähnlichkeiten mit der in Spezies der Gattung Legionella enthaltenen genomischen Sequenz aufweist, die aneinander angrenzende Bereiche der 23S-rRNS, der Spacerregion zwischen 5S-rRNS- und 23S-rRNS- und des 5S-rRNS-Bereiches einschließt. Die SEQ.ID.NO. 1 schließt nur einen relativ kleinen Teil der 23S-rRNS jedoch die vollständige Spacerregion und ca. 80% der 5S-rRNS ein.

SEQ.ID.NO. 1 stellt eine Nukleotidsequenz dar, aus welcher Teilsequenzen entnommen werden können, die gattungsspezifisch für Legionella sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Begriff Nukleinsäuresonde nicht im Hinblick auf die Funktion einschränkend betrachtet werden. Die oben genannten Eigenschaften sind maßgebend. Insbesondere sollen zu den Nukleinsäuresonden auch die sogenannten Probes oder Nachweissonden gezählt werden, deren Hybridisierung mit den in der Probe vorhandenen Legionellannukleinsäuren als Maß für die Anwesenheit des Bakteriums nachgewiesen werden kann. Dazu kann die Nukleinsäuresonde bevorzugt weitere Teile enthalten, die den Nachweis oder die Amplifikation nicht wesentlich nachteilig beeinflussen. Zu solchen Molekülteilen gehören beispielsweise Markierungen zum Nachweis der Sonden, bzw. Hybriden, die diese Sonde enthalten, Gruppen, welche eine Immobilisierung der Nukleinsäuresonde an eine feste Phase erlauben, feste Phasen als solche (z. B. Beads oder Oberflächen, z. B. von Reagenz- oder Detektionsgefäßen) oder weitere, nicht mit Legionella-Sequenzen interferierende Nukleotidsequenzen. Die Ausgestaltung der Nukleinsäuresonde richtet sich daher insbesondere nach der Art, wie der Nachweis der Legionella-Nukleinsäuren geführt werden soll.

Unter einer Nukleinsäuresonde wird ein Molekül mit einer festgelegten Aufeinanderfolge von Basen verstanden, welches in der Lage ist, mit natürlichen Nukleinsäuren Hybride aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen zu bilden. Hierzu gehören natürliche und künstliche Nukleinsäuren. Die künstlichen Nukleinsäuren unterscheiden sich von den natürlichen Nukleinsäuren dadurch, daß sie entweder im Basenteil (z. B. durch Verwendung von Basenanaloga, z. B. 7-deaza-dGTP) oder im Grundgerüst (Ersatz der Zucker- oder/und Phosphateinheiten durch andere chemische Molekülteile, z. B. Peptide) modifiziert sind. Derartige künstliche Nukleinsäuren sind beispielsweise auch die in WO 92/20702 beschriebenen Peptidnukleinsäuren (PNA). Wesentlich für die korrekte Funktionsweise der Nukleinsäuresonden ist die spezifische Basenpaarung, wodurch die Selektivität der Sonden erreicht wird. Besonders bevorzugt besteht eine Nukleinsäuresonde aus Desoxyribonukleinsäure

(DNS).

Unter einer Nukleinsäuresonde werden auch die sogenannten Primer verstanden, welche nach Hybridisierung mit Legionella-Nukleinsäuren unter Verwendung eines Enzyms verlängert werden können. Typische Verlängerungsreaktionen sind beispielsweise die Anhängung von Mononukleosidtriphosphateinheiten durch DNS-Polymerasen (z. B. E. coli DNS-Polymerase, Klenow-Fragment oder Thermus aquaticus-Polymerase) unter Verwendung der Legionella-Nukleinsäuren als Matrize. In diesem Fall wird mit den bislang bekannten Enzymen das 3'-Ende des Primers verlängert. Eine weitere Verlängerungsreaktion ist die Ligase-Reaktion, bei der die Nukleinsäuresonde mit einem weiteren Oligonukleotid enzymatisch verknüpft wird (z. B. EP-A-0 320 308). Zwischen der Polymerase- und der Ligasereaktion sind Mischformen bekannt (z. B. WO 90/01069).

Unter einer für Legionella gattungsspezifischen Nukleinsäuresonde wird eine Nukleinsäure verstanden, die mit einer Nukleinsäure hybridisiert, die eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ.ID.NO. 1 bzw. deren Komplement enthält, oder die mit allen der in Tabelle 1 genannten Legionellenspezies unter denselben Stringensbedingungen hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisieren diese Nukleinsäuren mit allen möglichen Spezies der Gattung Legionella.

Die gattungsspezifischen Sequenzen liegen bei der Sequenz der Fig. 1 bevorzugt im 23S- oder/und 5S-Bereich; wenngleich es bei geschickter Wahl der Hybridisierungsbedingungen auch möglich ist, gattungsspezifische Sonden auch im Spacer-Bereich zu entwerfen.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Erwartete Amplifikationslängen 23S-5S-Spacer-Region bei Verwendung von Primerpaar B/D

Species/ Serogroup	ATCC No. (NCTC)	Stamm	Amplifikationslänge/ komplette bestimmte Länge der Sequenz	EMBL Accession Number	SEQ ID. NO.
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33152	Philadelphia-1	232bp/336bp	Z30431	26
<i>L. pneumophila</i> sero 1	33153	Knoxville-1	232bp/336bp	Z30432	27
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43108	Benidorm 030E	232bp/336bp	Z30433	28
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43112	France 5811	232bp/336bp	Z30534	29
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43109	OLDA	232bp/336bp	Z30434	30
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43110	Oxford 4032E	231bp/335bp	Z30435	31
<i>L. pneumophila</i> sero 1	43113	Camperdown-1	232bp/336bp	Z30435	32
<i>L. pneumophila</i> sero 2	33154	Togus-1	232bp/336bp	Z30437	33
<i>L. pneumophila</i> sero 3	33155	Bloomington-2	232bp/336bp	Z30438	34
<i>L. pneumophila</i> sero 4	33156	Los Angeles-1	232bp/336bp	Z30439	35
<i>L. pneumophila</i> sero 4	n.a.	Portland	232bp/336bp	Z30440	36
<i>L. pneumophila</i> sero 5	33216	Dallas-1E	232bp/336bp	Z30441	37
<i>L. pneumophila</i> sero 5	(11417)	Cambridge-2	232bp/336bp	Z30442	38
<i>L. pneumophila</i> sero 6	33215	Chicago-2	232bp/336bp	Z30443	39
<i>L. pneumophila</i> sero 7	33823	Chicago-8	232bp/336bp	Z30444	40
<i>L. pneumophila</i> sero 8	35096	Concord-3	232bp/336bp	Z30445	41
<i>L. pneumophila</i> sero 9	35289	IN-23-G1-C2	232bp/336bp	Z30446	42
<i>L. pneumophila</i> sero 10	43283	Leiden-1	232bp/336bp	Z30447	43
<i>L. pneumophila</i> sero 11	43130	797-PA-H	232bp/336bp	Z30448	44
<i>L. pneumophila</i> sero 12	43290	570-CO-H	232bp/336bp	Z30449	45
<i>L. pneumophila</i> sero 13	43736	82 A 3105	232bp/336bp	Z30450	46
<i>L. pneumophila</i> sero 14	43073	1169-MN-H	232bp/336bp	Z30451	47
<i>L. anisa</i>	35292	WA-316-C3	267bp/371bp	Z30535	48
<i>L. brunensis</i>	n.a.	n.a.	246bp/350bp	Z30536	49
<i>L. cherrii</i>	35252	ORW	258bp/362bp	Z30537	50
<i>L. cincinnatiensis</i>	43753	72-OH-H	213bp/317bp	Z30452	51
<i>L. dumoffii</i>	33279	NY-23	255bp/359bp	Z30538	52
<i>L. erythra</i>	35303	SE-32A-C8	201bp/325bp	Z30453	53
<i>L. feeleii</i> sero 1	35072	WO-44C	238bp/342bp	Z30454	54
<i>L. feeleii</i> sero 2	35849	691-WI-H	238bp/342bp	Z30455	55
<i>L. israelensis</i>	43119	Bercovier-4	217bp/321bp	Z30583	56
<i>L. jordanis</i>	33623	BL-540	244bp/348bp	Z30539	57
<i>L. longbeachae</i> sero 1	33462	Long Beach-4	208bp/312bp	Z30456	58
<i>L. longbeachae</i> sero 2	33484	Tucker-1	208bp/312bp	Z30465	59
<i>L. maceachernii</i>	35300	PX-1-G2-E2	250bp/352bp	Z30461	60
<i>L. micdadei</i>	33218	Tatlock	267bp/371bp	Z30460	61
<i>L. moravica</i>	n.a.	316-36	236bp/340bp	Z30457	62
<i>L. oakridgensis</i>	33761	OR-10	197bp/302bp	Z30540	63
<i>L. rubrilucens</i>	35304	WA-270A-C2	219bp/324bp	Z30458	64
<i>L. saintthelmsi</i>	35248	Mt St Helens-4	212bp/316bp	Z30459	65
<i>L. spiritensis</i>	35249	Mt St Helens-9	246bp/350bp	Z30464	66
<i>L. steigerwaltii</i>	35302	SC-18-C9	256bp/360bp	Z30463	67
<i>L. wadsworthii</i>	33877	81-716A	262bp/366bp	Z30462	68

Unter speziesspezifischen Nukleinsäuresonden werden Nukleinsäuren verstanden, die mit allen Serovaren einer Legionellaspesies unter denselben Stringenzbedingungen hybridisieren. Solche Sonden sind mit ihrer Sequenz in Beispiel 3 wiedergegeben. Darunter befindet sich auch eine *L. pneumophila*-Speziessonde, die mit allen Serovaren der Spezies *pneumophila*, nicht jedoch mit den übrigen, in Tabelle 1 genannten, Spezies aus der Gattung *Legionella* hybridisiert.

Die Nukleinsäuresonden der vorliegenden Erfindung sind mindestens 15 Basen lang, besonders bevorzugt zwischen 23 und 40 Basen. Es handelt sich somit um Nukleinsäuren, welche auf einfache Weise durch chemische Synthese in sogenannten (Nukleinsäure-)Synthesizern hergestellt werden können. Sequenzen, die als gattungsspezifische Sequenz für *Legionella* zu gebrauchen sind, erhält man durch Ausschneiden einer mindestens 15 Basen langen Sequenz aus SEQ.ID.NO. 1, wobei eine Abweichung in 1 oder 2 Basen der Gattungsspezifität in Abhängigkeit von den Hybridisierungsbedingungen in den meisten Fällen keinen Abbruch tun wird. Es ist selbstver-

ständig, daß die Anzahl der Abweichungen mit zunehmender Größe der Nukleinsäuresonde zunehmen kann. Erfindungsgemäß sind daher Sonden bevorzugt, die zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 sind oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 sind. Besonders bevorzugt sind Sonden, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz (in direkter Aufeinanderfolge) enthalten, die streng homolog oder streng komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.NO. 1 ist.

Die Gattungsspezifität könnte leiden, wenn die Sonde weitere Legionellaspezies-spezifische Sequenzen oder nicht-Legionella-spezifische Sequenzen enthält, die eine zu spezifische bzw. zu unspezifische Hybridisierung bewirken würden. Bevorzugt sind weitere Legionella-spezifischen Sequenzen, sofern sie überhaupt vorliegen, nicht mehr als 15 Basen lang.

Des weiteren kann eine Nukleinsäuresonde im Legionella-unspezifischen Teil funktionelle Nukleotidsequenzen, wie sie beispielsweise für Promotoren oder Origins of Replication charakteristisch sind, enthalten.

Innerhalb der SEQ.ID.NO. 1 sind bestimmte Bereiche zur Auswahl von gattungsspezifischen Sequenzen insbesondere für Nachweissonden besonders bevorzugt. Besonders bevorzugte Bereiche liegen zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 sowie 307 und 286. Besonders bevorzugt schließt die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 268 bis 296 ein.

Das erfindungsgemäße Amplifikationsverfahren kommt im Gegensatz zum Stand der Technik mit weniger als 7 Primern aus. Dies ist beispielsweise möglich dadurch, daß als Primer eine oder mehrere der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresonden benutzt werden. Ein Amplifikationsverfahren, welches mit nur einem Primer auskommt, wird schon dadurch realisiert, daß der Primer mit der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert, mit Mononukleosidtriphosphaten unter Einwirkung einer DNS-Polymerase verlängert wird, das Verlängerungsprodukt von der Matrizenukleinsäure getrennt und der obige Vorgang mit einem neuen Primer wiederholt wird. In jedem Zyklus wird daher pro Nukleinsäure ein Verlängerungsprodukt gebildet. Es handelt sich somit um ein lineares Amplifikationsverfahren. Exponentielle Amplifikation ist theoretisch beispielsweise dann erreichbar, wenn 2 Primer eingesetzt werden, welche die prinzipiellen Bedingungen, wie sie in der EP-A-0 201 184 beschrieben sind, erfüllen. In einer vorteilhaften Ausführungsform wird ein weiteres Primerpaar eingesetzt, welches auf dem amplifizierten Nukleinsäurefragment zwischen den Hybridisierungspositionen des ersten Primerpaares hybridisiert. Diese Ausführungsform wird gelegentlich auch als "nested PCR" bezeichnet. Darin werden insgesamt 4 verschiedene Primer eingesetzt.

Auch bei den auf Transkriptionsreaktionen beruhenden Amplifikationsverfahren werden im allgemeinen Fall 2 Nukleinsäuresonden eingesetzt, die entweder auf gegenläufigen Strängen oder auf einem Strang der zu amplifizierenden Nukleinsäure hybridisiert werden können.

Erfindungsgemäß handelt es sich für das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren bei allen als Primer fungierenden Nukleinsäuresonden um Legionella-gattungsspezifische Sonden. In einem besonders bevorzugten Fall hybridisiert einer der Primer mit einem Strang der Legionella-Nukleinsäure in der 23S-rDNS-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-rDNS-Region. Dadurch wird erreicht, daß das amplifizierte Teilstück der Nukleinsäuresequenz der Legionellen sowohl Teile der 23S-rDNS-Region, der 5S-rDNS-Region als auch der dazwischenliegenden Spacerregion umfaßt. Zum Verständnis muß an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, daß sich die Amplifikate unterschiedlicher Spezies in der Sequenz unterscheiden, der zwischen den einander zugewandten Enden der ursprünglichen Primer liegt. Dabei handelt es sich eben bevorzugt um Sequenzen der Spacer-Region.

Das erfindungsgemäße gattungsgemäße Amplifikationsverfahren kann für mehrere Zwecke benutzt werden. In einer ersten Möglichkeit (z. B. im Sinne eines Screenings) kann die Summe aller in der Probe vorliegenden Spezies der Gattung Legionella nachgewiesen werden. Dies ist beispielsweise möglich, wenn die in der gattungsspezifischen Amplifikation erzeugten Amplifikate mit einer weiteren gattungsspezifischen (gewünschtenfalls nachweisbar markierten) Nukleinsäuresonde zur Hybridisierung gebracht und die gebildeten Hybride nachgewiesen werden. Dabei kann die Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) so gewählt werden, daß sie in den Bereichen nahe den ursprünglichen Primerhybridisierungsstellen hybridisiert, jedoch wird die Aussagekraft des gattungsspezifischen Nachweises dadurch noch erhöht, daß die Nukleinsäuresonde in dem zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer liegenden Bereich der Amplifikate hybridisiert. Besonders bevorzugt hybridisiert die gattungsspezifische Nachweissonde zwischen den Positionen 242 und 299 von SEQ.ID.NO. 1 und ist zwischen 25 und 35 Nukleotiden, besonders bevorzugt 26 bis 30 Nukleotiden lang. Mit der Veränderung der Länge der Sonde muß die Hybridisierungstemperatur entsprechend angepaßt werden. Die optimale gattungsspezifische Sonde hybridisiert zwischen den Positionen 268 und 296 und ist somit 29 Nukleotide lang.

Prinzipiell sind für den Nachweis der Amplifikate alle bekannten Nachweisformate verwendbar, beispielsweise Auftrennung nach Größe der Amplifikate (z. B. Gelelektrophorese) aber auch die Blot-Verfahren. Beispielsweise kann schon aufgrund der Größenvariabilitäten der Spacer-Region eine Differenzierung von Non-Pneumophila-Spezies im einfachen, hochauflösenden Agarosegel durchgeführt werden, was im Sinne eines Screeningverfahrens eine rasche orientierende Information liefert. Auf einen Nachweis, der auf einem Hybridisierungsschritt mit einer Nachweissonde beruht, kann jedoch meist nicht verzichtet werden. Als besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung des Reverse-Dot-Blot-Formats erwiesen. Hierzu wird beispielsweise eine gattungsspezifische Nukleinsäuresonde auf einer Membran immobilisiert und anschließend das Produkt der Amplifikationsreaktion auf die immobilisierten Sonden gegeben. Dazu müssen die Amplifikate gegebenenfalls vorher einzelsträngig gemacht werden. Wenn während der Amplifikation markierte Mononukleosidtriphosphate eingebaut wurden, ist der Nachweis der über die Nukleinsäuresonde immobilisierten Amplifikate nach Abwaschen nicht gebundener Nukleinsäuren auf einfache Weise möglich. Ein solches Format ist beispielsweise in der EP-A-0 237 362 beschrieben. Auf den Inhalt dieser Patentanmeldung wird hiermit vollinhaltlich Bezug genommen.

Ein Nachweis ist jedoch auch über die sogenannten Sandwich-Verfahren möglich, bei denen neben der

immobilisierten Nukleinsäuresonde eine weitere, markierte gattungsspezifische Nukleinsäuresonde (Nachweissonde) eingesetzt wird, die mit den Amplifikaten an einer anderen Position hybridisiert als die Festphasen-gebundene Sonde. Dieses Verfahren ist prinzipiell in EP-B-0 079 139 beschrieben.

Das erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikationsverfahren ermöglicht jedoch auch den verlässlichen und unkomplizierten Nachweis *Legionella*-Spezies (z. B. für den klinischen Routinealltag) oder Gemischen von Spezies (z. B. eine Unterscheidung von *L. pneumophila* von non-*pneumophila*). Für diesen Fall kann im Anschluß an das gattungsspezifische Amplifikationsverfahren eine Hybridisierung mit einer (gewünschtenfalls markierten) speziesspezifischen Sonde (Nachweissonde) durchgeführt werden, die im amplifizierten Bereich zwischen den aufeinander zu zeigenden Enden der Primer hybridisiert. In SEQ.ID-Nos. 26—68 sind Sequenzen, aus welchen die speziesspezifischen Sequenzen ausgewählt werden können, für einzelne Spezies angegeben. Die speziesspezifischen Teile befinden sich insbesondere im Spacer-Bereich, der bevorzugt mittels der gattungsspezifischen Primer amplifiziert wird. Die Lage der Amplifikate (z. B. wie in Tabelle 1 angegeben) ergibt sich aus den Hybridisierungspositionen der Primer (in Tabelle 1 ist dies das Primerpaar B/D). Besonders bevorzugte speziesspezifische Nachweissonden sind in Beispiel 3.7 angegeben.

Speziesspezifische Nachweissonden, die auf diesen Spacersequenzen beruhen, sind bevorzugt länger als 15 bp und kleiner als die gesamte Spacerregion.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht daher den multiplen Nachweis von *Legionella*-Spezies unter Verwendung einer einzigen in einer vorgeschalteten gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion hergestellten Reaktionsmischung, die Amplifikate von Teilen der in der Probe anwesenden *Legionella*-Spezies enthält. Ein Vorteil der Erfindung ist daher, daß sie einen einfacheren, d. h. weniger komplexen Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* ermöglicht.

Ebenfalls Gegenstand ist daher ein Paar von Primern zur Amplifikation von *Legionella*-Nukleinsäuren, von denen einer mit einem Strang der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des *Legionella*-Genoms hybridisiert.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist eine doppelsträngige *Legionella*-spezifische Nukleinsäure, enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-rDNS und 23S-rDNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-rDNS und 23S-rDNS, die ein Genom direkt an die Spacerregion anschließen. Bevorzugt ist diese doppelsträngige Nukleinsäure höchstens 371 bp lang und ist das Produkt einer gattungsspezifischen Amplifikationsreaktion.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zum Nachweis von *Legionella*-Spezies enthaltend mindestens eine *Legionella*-gattungsspezifische Nukleinsäure und mindestens eine *Legionella*-speziesspezifische Sonde.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern.

#### Beispiel 1

##### Bakteriengewinnung und Anzucht

Die hier verwendeten *Legionellen* "Type strains" wurden auf gepuffertem Hefe-Kohle-Extraktagar (P. H. Edelstein, Laboratory Diagnosis of infections caused by legionellae, Eur. J. Clin. Microbiol. Vol. 6, 1, 4—10 (1987)) unter Zusatz von  $\alpha$ -Ketoglutarat bei einer Inkubationstemperatur von 35°C in feuchter CO<sub>2</sub>-Atmosphäre für mindestens 3 Tage angezüchtet. Gram-Färbungen, Mikroskopie und Inkubation von Blut-Agar-Platten zeigten kein Wachstum anderer Bakterien. Die *Legionellen* wurden mit 3 ml bidestilliertem Wasser von den Platten geerntet und verdünnt, mit 12.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 500 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Logarithmische Verdünnungsreihen und Auszählen der Kolonien auf Agarplatten ergaben durchschnittlich 10<sup>10</sup> KBE/ml.

#### Beispiel 2

##### DNS-Aufschluß

Je ein 250 µl-Aliquot der jeweiligen Bakterienkultur wurde zur Freisetzung der DNS alkalisch lysiert (PCR: Clinical diagnostics and research; Springer Verlag Berlin/Heidelberg 1992, S. 79—80), indem 250 µl einer 200 mM NaOH-Lösung hinzugefügt, mit 100 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und für 20 Minuten in einem auf 95°C vorgeheiztem Thermomixer inkubiert wurden. Nach Schütteln und Zentrifugation wurden 32 µl Tris-HCl (pH 5,0) zur Neutralisierung hinzugefügt, erneut geschüttelt und zentrifugiert. Kontrollproben mit bidestilliertem Wasser wurden identisch behandelt, um mögliche Kontaminationen während der Probenaufbereitung zu erkennen.

Die so gewonnenen Nukleinsäuren konnten in den Amplifikations- und Hybridisierungsexperimenten eingesetzt werden.

#### Beispiel 3

##### Nachweis von *Legionellen* (Gattung und Spezies)

Der Nachweis von *Legionellen* geschah durch erfindungsgemäße gattungsspezifische Amplifikation unter Einbau von mit Digoxigenin markiertem dUTP. Die markierten Amplifikate wurden anschließend mittels der Reverse Dot-Block-Technik (Kawasaki et al.: Genetic analysis using polymerase chain reaction — amplified DNS and immobilized oligonucleotide probes: reverse dot-blot typing, in: Methods in Enzymology, Band 218,

1993) nachgewiesen.

### 1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

5 Boehringer Mannheim Terminale Transferase Kit 220—582

200 pmol Oligonukleotid  
20 µl 5 × Reaktionspuffer  
6 µl 25 mM CoCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,5 mM)  
10 8 µl 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)  
2,4 µl Terminale Transferase (60 U)  
ddH<sub>2</sub>O ad 100 µl

Gemisch eine Stunde bei 37° C inkubieren.

15

### 2. Polymerasekettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte

PCR 25 µl Ansätze:

20 3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)  
1,25 µl Boehringer DIG DNS Labeling mixture  
2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I  
je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 mM)  
1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)  
25 H<sub>2</sub>O ad 24 µl  
1 µs DNS

Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)

30 95° — 3 Min.  
95° — 30 Sek., 54° — 25 Sek., 72° — 30 Sek.: 30 Zyklen  
72° — 5 Min.  
herabkühlen auf 6°

35

### 3. Vorbereitung der Membranen

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml krenzlinken (Stratalinker®, Stratagene).

40

Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen):  
(alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)  
Waschlösung: 5 × SSPE, 0,5% SDS  
30 Minuten bei 61°

45

Mit bidest. H<sub>2</sub>O kurz waschen  
lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei —20° aufbewahrt werden.

### 4. Hybridisierung

50 Prähybridisierung — in einzelnen, nummerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

Lösung (je 300 ml) 5 × SSPE, 0,5% SDS,  
0,5% Dextransulfat

55

30 Min. bei 61°,

Hybridisierung

60

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.  
Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:

65

2 × SSPE  
0,1% SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.



1993) nachgewiesen.

### 1. Sonden-Herstellung (Tailing-Reaktion)

5 Boehringer Mannheim Terminale Transferase Kit 220—582

200 pmol Oligonukleotid  
20 µl 5 × Reaktionspuffer  
6 µl 25 mM CoCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 1,5 mM)  
10 8 µl 10 mM dTTP (Gesamtmenge 80 nmol)  
2,4 µl Terminale Transferase (60 U)  
ddH<sub>2</sub>O ad 100 µl

Gemisch eine Stunde bei 37°C inkubieren.

15

### 2. Polymerasekettenreaktion (PCR) & Digoxigenin-Markierung der PCR-Produkte

PCR 25 µl Ansätze:

20 3,75 µl dNTPs (1 mM Konz)  
1,25 µl Boehringer DIG DNS Labeling mixture  
2,5 µl Perkin-Elmer Puffer I  
je 0,75 µl Primer (Stammlösung 10 mM)  
1 µl Taq Polymerase (Perkin-Elmer) (verdünnt 1 : 10)  
25 H<sub>2</sub>O ad 24 µl  
1 µl DNS

Thermoprofil (Primer B & D; Perkin-Elmer 9600-Thermocycler)

30 95° — 3 Min.  
95° — 30 Sek., 54° — 25 Sek., 72° — 30 Sek.: 30 Zyklen  
72° — 5 Min.  
herabkühlen auf 6°

35

### 3. Vorbereitung der Membranen

Boehringer Mannheim positively charged Nylon membranes in dünne Streifen schneiden. Mit Bleistift beschriften und mit abgeschnittener 1 ml-Pipettenspitze Kreise in die Membran "stampfen". 1 µl (2 pmol) Sonde auftragen, 10 Minuten lufttrocknen, mit 120 ml kreuzlinken (Stratalinker®, Stratagene).

40

Waschen der Membran (um nicht gebundene Sonde zu entfernen):  
(alle Streifen zusammen in einem 50 ml Falcon®-Röhrchen)  
Waschlösung: 5 × SSPE, 0,5% SDS  
30 Minuten bei 61°

45

Mit bidest. H<sub>2</sub>O kurz waschen  
lufttrocknen, Streifen können nach diesem Schritt bei -20° aufbewahrt werden.

### 4. Hybridisierung

50 Prähybridisierung — in einzelnen, nummerierten Eppis (Eppendorf-Gefäß)

Lösung (je 300 µl) 5 × SSPE, 0,5% SDS,  
0,5% Dextransulfat

55

30 Min. bei 61°

Hybridisierung

60

PCR-Produkt wird 10 Minuten bei 95° denaturiert und zügig nach Ende der Prähybridisierung zugegeben.  
Genau eine Stunde bei 61° bei sanfter Rotation hybridisieren lassen.

Nach Abschluß der Hybridisierung werden die Membranen (im selben Eppendorf-Gefäß, mit jeweils 300 µl der folgenden Lösung) gewaschen:

65

2 × SSPE  
0,1% SDS

Waschschritte (unter leichtem Schütteln): zweimal 5 Min. bei Raumtemperatur und einmal 10 Min. bei 65°.

## 5. Detektion

Alle Schritte werden unter ständigem leichtem Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffer-volumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504):

a) 30 Min. D1-Puffer	5
b) 30 Min D2-Puffer	
c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren	
d) 2 x 15 Min. D1-Puffer	
e) kurze Inkubierung in D3-Puffer	10
f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle plziert:	
45 µl NBT	
35 µl X-Phosphat-Lösung	
10 ml D3-Puffer	15
g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.	
h) Stopplösung: D4-Puffer	
i) lufttrocknen	20
Puffer	
20 x SSPE	3M NaCl, 175,3 g NaCl
	0,2 M Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 27,6 g Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20 mM EDTA, 7,4 g EDTA
	pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml
2 x SDS	20 g SDS
	pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen,
	aqua bidest ad 1.000 ml
D1	100 mM Maleinsäure
	150 mM NaCl
	0,3% (w/v) Tween 20
	pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen
D2	1,0% Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor
	Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.
D3	100 mM TrisHCl
	100 mM NaCl
	50 mM MgCl <sub>2</sub>
	pH auf 9,5 bei 20° einstellen
D4	10 mM Tris HCl
	1 mM EDTA
	pH auf 8,0 einstellen
	45

## 6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGTCTTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2	50
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3	
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4	
21 mer: AATGTTTCACTTCTGAGTTTCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5	55
		60
		65

## 5. Detektion

Alle Schritte werden unter ständigem leichtem Schütteln in einem 50 ml Falcon-Röhrchen durchgeführt (Puffer-volumen ca. 30 ml) (Boehringer Mannheim Katalog Nr. 117504):

- a) 30 Min. D1-Puffer  
 b) 30 Min D2-Puffer  
 c) 3 µl Antikörper-Konjugatlösung mit 30 ml frischem D2-Puffer vermischen, 30 Min. inkubieren  
 d) 2 × 15 Min. D1-Puffer  
 e) kurze Inkubierung in D3-Puffer  
 f) Die Membranen werden mit der DNS-Seite nach oben in einer Klarsichthülle plaziert:  
 45 µl NBT  
 35 µl X-Phosphat-Lösung  
 10 ml D3-Puffer  
 g) Die Farblösung zugeben, die Membranen dabei nicht bewegen. Genau 15 Min. entwickeln.  
 h) Stopplösung: D4-Puffer  
 i) lufttrocknen

## Puffer

20 x SSPE	3M NaCl, 175,3 g NaCl 0,2 M Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 27,6 g Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM EDTA, 7,4 g EDTA pH auf 7,4 mit NaOH einstellen, aqua bidest. ad 1.000 ml	25
2 x SDS	20 g SDS pH auf 7,2 mit HCl (ein paar Tropfen) einstellen, aqua bidest ad 1.000 ml	30
D1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl 0,3% (w/v) Tween 20 pH auf 7,5 bei 20° mit NaOH einstellen	35
D2	1,0% Blocking-Reagens (Kasein, Boehringer Kit), gelöst in D1, muß ca. eine Stunde vor Gebrauch hergestellt werden bzw. kann bei -20° aufbewahrt werden.	40
D3	100 mM TrisHCl 100 mM NaCl 50 mM MgCl <sub>2</sub> pH auf 9,5 bei 20° einstellen	45
D4	10 mM Tris HCl 1 mM EDTA pH auf 8,0 einstellen	50

## 6. PCR-Primer

18mer: 5'-GGCTGATTGTCTTGACCA-3' (Primer B)	SEQ.ID.No. 2	50
20mer: 5'-AGGAAGCCTCACACTATCAT-3' (Primer D)	SEQ.ID.No. 3	
24mer: GTTGAAGACTACGACGTTGATAGG (Primer A)	SEQ.ID.No. 4	
21 mer: AATGTTTCACTTCTGAGTTTCG (Primer C)	SEQ.ID.No. 5	55

## 7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS)

## Gattungssonde:

5 29mer: 5'-AACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAA-3' SEQ.ID.No. 6

*L. pneumophila*-Speziessonde:

10 31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGTAACCTCTGACTC-3' SEQ.ID.No. 7

*L. anisa*-Speziessonde:

15 36mer: 5'-ATGCGAATACAAGATGTAGGTTGGGC-3' SEQ.ID.No. 8

*L. micdadei*-Speziessonde:

20 34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATACAGAGTTT-3'  
SEQ.ID.No. 9

*L. brunensis*-Speziessonde:

25 31mer: 5'-CCTGTTTTTACAGAGCACTTAACAATGCTCT-3' SEQ.ID.No. 10

*L. cherii*-Speziessonde:

30 29mer: 5'-AATGCAAATACAAGAAATTTAGGTTGGGC-3' SEQ.ID.No. 11

*L. cincinnatiensis*-Speziessonde:

35 27mer: 5'-CTCTCTTTTACCGGAAGTAACGCG-3' SEQ.ID.No. 12

*L. dumoffii*-Speziessonde:

40 26mer: 5'-ATCAATACCTGGGGTAGGACACCTGC-3' SEQ.ID.No. 13

*L. erythra*-Speziessonde:

45 24mer: 5'-AACCCGGGTAAGACCGGAAAAACC-3' SEQ.ID.No. 14

*L. feeleii*-Speziessonde:

50 27mer: 5'-GCAAAAATGAAAGACAAATGCGTTTGT-3' SEQ.ID.No. 15

*L. israelensis*-Speziessonde:

55 27mer: 5'-TTAAACGCTTGTGAATCAAACCCATTC-3' SEQ.ID.No. 16

*L. jordania*-Speziessonde:

60 27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCCTAACATGGG-3' SEQ.ID.No. 17

## 7. Oligonucleotidsonden (5S-rDNS)

## Gattungssonde:

5 29mer: 5'-AACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAA-3' SEQ.ID.No. 6

## L. pneumophila-Speziessonde:

10 31mer: 5'-ACGTGAAACGTATCGTGTAACCTCTGACTC-3' SEQ.ID.No. 7

## L. anisa-Speziessonde:

15 36mer: 5'-ATGCGAATACAAGATGTAGGTTGGGC-3' SEQ.ID.No. 8

## L. micdadei-Speziessonde:

20 34mer: 5'-ATGTAAATTGCTCAGACAAATGAATACAGAGTTT-3'  
SEQ.ID.No. 9

## L. brunensis-Speziessonde:

25 31mer: 5'-CCTGTTTTTACAGAGCACTTAACAATGCTCT-3' SEQ.ID.No. 10

## L. chernii-Speziessonde:

30 29mer: 5'-AATGCAAATACAAGAAATTTAGGTTGGGC-3' SEQ.ID.No. 11

## L. cincinnattiensis-Speziessonde:

35 27mer: 5'-CTCTCTTTRTTACCGGAAGTAACGCG-3' SEQ.ID.No. 12

## L. dumoffii-Speziessonde:

40 26mer: 5'-ATCAATACCTGGGGTAGGACACCTGC-3' SEQ.ID.No. 13

## L. erythra-Speziessonde:

45 24mer: 5'-AACCCGGGTAAGACCGGAAAAACC-3' SEQ.ID.No. 14

## L. feeleli-Speziessonde:

50 27mer: 5'-GCAAAAATGAAAGACAAATGCGTTTGT-3' SEQ.ID.No. 15

## L. israelensis-Speziessonde:

55 27mer: 5'-TTAAACGCTTGTGAATCAAACCCATTTC-3' SEQ.ID.No. 16

## L. jordanis-Speziessonde:

60 27mer: 5'-TGATGAATGAATATCCCCTAACATGGG-3' SEQ.ID.No. 17

65

*L. longbeachae*-Speziessonde:

39mer: 5'-TGCTTGATATAAGATATAATACCTCTTTATTTACCTGAG-3'

SEQ.ID.No. 18

5

*L. maceachernii*-Speziessonde:

32mer: 5'-GGCAATACTTTAATTAAAGGCATTAATGCCTA-3'

SEQ.ID.No. 19

10

*L. moravica*-Speziessonde:

23mer: 5'-AGGCCTTGGGCTTGTTGATTGAA-3' SEQ.ID.No. 20

15

*L. sainthelensi*-Speziessonde:

40mer: 5'-GTGCTGAATATAAGATATAATGTTACTCTCTTTATTTACC-3'

SEQ.ID.No. 21

20

25

*L. spiritensis*-Speziessonde:

25mer: 5'-GTGTGCCCTGAAGAAGAAACAGGGT-3'

SEQ.ID.No. 22

30

*L. steigerwaltii*-Speziessonde:

23mer: 5'-AATGTGTATACAAGCTGTAGGTTGGCCA-3'

SEQ.ID.No. 23

35

*L. wadsworthii*-Speziessonde:

30mer: 5'-GTACGTACGAATTAGAGATTGGGTCTAGGC-3'

SEQ.ID.No. 24

40

## 8. Nachweisverfahren

## a) Reverse dot-blot-Hybridisierung mit 4 verschiedenen Sonden

45

Gemäß obigem Arbeitsprotokoll wurden Nachweisverfahren unter Verwendung des gattungsspezifischen Amplifikationsverfahrens und einer gattungs-(A) bzw. 3-speziesspezifischen (B: *L. pneumophila*; C: *L. anisa*; D: *L. micdadei*) Sonden durchgeführt. In Fig. 2 ist die Farbentwicklung an 10 Filtern gezeigt. Es ist klar erkenntlich, daß die genus-(gattungsspezifische) Sonde (A) in jedem Falle ein Nachweissignal liefert. Die *L. pneumophila*-spezifische Sonde (B) reagiert nur mit dem Filter, der auch den Serovar 1, Philadelphia von *L. pneumophila* enthält. Mit der *L. anisa*-spezifischen Sonde (C) ist im Filter Nr. 4 ein deutliches Signal sichtbar. Die Spezies *L. micdadei* ließ sich mit der *L. micdadei*-spezifischen Sonde (D) nachweisen. *L. gormanii* konnte mit der gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden (Filter Nr. 9).

50

Die Belegung der Filter mit nachzuweisenden Nukleinsäuren war folgende:

55

- 1: *L. dumofii* (2pmol probe)
- 2: *L. anisa* (2pmol probe)
- 3: *L. anisa* (4pmol probe)
- 4: *L. anisa* (8pmol probe)
- 5: *L. micdadei* ATCC 33218 (2pmol probe)
- 6: *L. micdadei* ATCC 33218 (4pmol probe)
- 7: *L. micdadei* L 5443/90 (2pmol probe)
- 8: *L. micdadei* L 5443/90 (4pmol probe)
- 9: *L. gormanii*
- 10: *L. pneumophila* sero 1 Philadelphia

60

65

## Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region von Pneumophila und non-Pneumophila Spezies

In Fig. 3, 4 und 5 ist das Ergebnis der Amplifikation der 23S-5S-Spacer Region mit Hilfe der gattungsspezifischen Primer gemäß der vorliegenden Erfindung gezeigt. Es ist klar erkenntlich, daß in jedem Fall eine Amplifikation stattfindet, wobei sich in vielen Fällen die Größe der Amplifikate der einzelnen Spezies unterscheidet. Über die Größe der Amplifikate ist daher eine Unterscheidung der Spezies von Legionella nach gattungsspezifischer Amplifikation möglich.

- 1: *L. pneumophila* sero 12 570-CO-H (Fig. 3)  
 2: *L. pneumophila* sero 13  
 3: *L. pneumophila* sero 14 1169-MN-H  
 4: *L. anisa* WA-316-C3  
 5: *L. brunensis*  
 6: *L. cherii* ORW  
 7: *L. cinclinattensis* 72-OH-H  
 8: *L. dumofil* NY-23  
 9: *L. erythra* SE-32A-C8  
 10: *L. feeleeii* sero 1 WO-44C  
 11: *L. feeleeii* sero 2 691-WI-H  
 12: *L. israelensis* Bercovier-4  
 M: 100bp DNA size marker

- 1: *L. jordanis* BL-540 (Fig. 4)  
 2: *L. longbeachae* sero 1 Long Beach-4  
 3: *L. longbeachae* sero 2 Tucker-1  
 4: *L. maceachernii* PX-1-G2-E2  
 5: *L. micdadei* TATLOCK  
 6: *L. moravica* 316-36  
 7: *L. oakridgensis* OR-10  
 8: *L. rubrilucens* WA-270-C2  
 9: *L. sainthelensi* Mt. St. Helens-4  
 10: *L. spiritensis* Mt. St. Helens-9  
 11: *L. steigerwaltii* SC-18-C9  
 12: *L. wadsworthii* 81-716A  
 M: 100bp DNA size marker

- 1: negative control (Fig. 5)  
 2: *L. pneumophila* sero 1 Philadelphia 1  
 3: *L. pneumophila* sero 2 Togu-1  
 4: *L. pneumophila* sero 3 Bloomington-2  
 5: *L. pneumophila* sero 4 Los Angeles-1  
 6: *L. pneumophila* sero 5 Dallas-1B  
 7: *L. pneumophila* sero 6 Chicago-2  
 8: *L. pneumophila* sero 7 Chicago-8  
 9: *L. pneumophila* sero 8 Concord-3  
 10: *L. pneumophila* sero 9 IN-23-G1-C2  
 11: *L. pneumophila* sero 19 Leiden-1  
 12: *L. pneumophila* sero 11 797-PA-H  
 M: 100bp DNA size marker

Anstelle der in Beispiel 3 verwendeten Primer B und D können auch Primer eingesetzt werden, deren Hybridisierungspositionen auf SEQ.ID.NO. 1 abweichen. Im folgenden sind konkrete Hybridisierungspositionen (erste Basenpaarung und Länge) von weiteren Primern angegeben. Auch bezüglich der gattungsspezifischen Sonde sind im folgenden gleichfalls geeignete Sonden angegeben. Ebenfalls im folgenden angegeben ist, welche Kombinationen der Primer für eine gattungsspezifische Amplifikation besonders geeignet sind.

## Beispiel 4

## Variationsmöglichkeiten der Primer und Sonden

## Primer

## Primer B — Variationsmöglichkeiten

- 1) Pos. 104, 18mer,  $T_m$  43,9° (Primer B aus Beispiel 3)  
 2) Pos. 105, 21mer,  $T_m$  43,0°  
 3) Pos. 110, 22mer,  $T_m$  42,8°  
 4) Pos. 103, 18mer,  $T_m$  43,9°

- 5) Pos. 101, 19mer,  $T_m$  42,7°
- 6) Pos. 100, 19mer,  $T_m$  43,5°
- 7) Pos. 99, 20mer,  $T_m$  44,2°
- 8) Pos. 100, 20mer,  $T_m$  45,0°
- 9) Pos. 98, 20mer,  $T_m$  43,5° 5
- 10) Pos. 94, 21mer,  $T_m$  43,1°
- 11) Pos. 104, 19mer,  $T_m$  45,2°
- 12) Pos. 103, 23mer,  $T_m$  46,1°
- 13) Pos. 113, 23mer,  $T_m$  44,7°
- 14) Pos. 102, 19mer,  $T_m$  46,3° 10
- 15) Pos. 100, 20mer,  $T_m$  45,0°
- 16) Pos. 99, 21mer,  $T_m$  45,6°
- 17) Pos. 98, 21mer,  $T_m$  45,8°
- 18) Pos. 96, 22mer,  $T_m$  45,5°
- 19) Pos. 105, 22mer,  $T_m$  45,1° 15
- 20) Pos. 109, 23mer,  $T_m$  44,0°

#### Primer D – Variationsmöglichkeiten

- 21) Pos. 316, 20mer,  $T_m$  43,7° (Primer D aus Beispiel 3) 20
- 22) Pos. 312, 19mer,  $T_m$  46,0°
- 23) Pos. 317, 20mer,  $T_m$  44,9°

#### Primer A:

- 1) Pos. 34, 21mer,  $T_m$  44,5° 25
- 2) Pos. 35, 22mer,  $T_m$  45,4°
- 3) Pos. 37, 21mer,  $T_m$  44,5°
- 4) Pos. 39, 20mer,  $T_m$  44,6°
- 5) Pos. 38, 29mer,  $T_m$  42,1° 30
- 6) Pos. 31, 18mer,  $T_m$  43,1°
- 7) Pos. 29, 18mer,  $T_m$  45,9°
- 8) Pos. 27, 18mer,  $T_m$  43,2°
- 9) Pos. 25, 18mer,  $T_m$  45,4°
- 10) Pos. 41, 19mer,  $T_m$  43,8° 35

#### Primer C:

- 11) Pos. 286, 21mer,  $T_m$  44,7° 40
- 12) Pos. 286, 20mer,  $T_m$  42,4°

#### Variationsmöglichkeiten der 5S-Gattungssonde (nur für Primerkombination B/D)

- Pos. 268, 29mer,  $T_m$  61,0° (in Beispiel 3 verwendete Sonde)
- Pos. 269, 29mer,  $T_m$  60,7° 45
- Pos. 270, 29mer,  $T_m$  60,7°
- Pos. 271, 30mer,  $T_m$  61,5°
- Pos. 267, 29mer,  $T_m$  61,4°
- Pos. 263, 27mer,  $T_m$  60,6° 50

#### 23S Gattungssonde (nur für Primerkombination A/C geeignet)

5'-TTGTAAGTAATTGGCTGATTGTCTTGACCATA-3'

SEQ.ID No. 25 55

#### Variationsmöglichkeiten der L-pneumophila Speziessonde (nur für Primärkombination B/D und A/C geeignet)

- Pos. 162, 39mer,  $T_m$  59,1° (in Beispiel 3 verwendete Sonde) 60
- Pos. 160, 32mer,  $T_m$  59,3°
- Pos. 163, 31mer,  $T_m$  60,1°
- Pos. 159, 33mer,  $T_m$  59,4°

Die Positionsangaben (5'-terminale Base) beziehen sich auf die in Fig. 1 abgebildete Sequenz, wobei Primer B und A komplementär zu den Teilen der Sequenz von Fig. 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen, und Primer D und C sequenzidentisch zu den Teilen der Sequenz von Fig. 1 sind, die bei der jeweiligen Position beginnen und sich stromabwärts (von der Sequenz in Fig. 1 aus gesehen) fortsetzen. 65



## Primerkombinationen

	Primer B/D	Primer A/C
5	1/21	1/11
	2/21	2/11
	3/21	3/11
	5/21	4/11
	6/21	5/12
10	7/21	6/12
	9/21	7/11
	10/21	8/12
	11/22	9/11
15	12/22	10/11
	13/22	
	14/22	
	15/22	
	16/22	
20	17/22	
	18/22	
	11/23	
	4/23	
25	19/23	
	20/23	
	8/23	
	17/23	

Alle angegebenen Primer und Nukleotidsequenzen sind DNS (Oligonukleotide im Falle der Primer und Sonden) linear, einzelsträngig.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Sonden spezifisch für *Legionella*, d. h. sie besitzen keine Wirkung als Primer bzw. Nachweissonden für Organismen, die nicht zur Gattung *Legionella* gehören. Die Primerpaare B/D und A/C wurden als nicht wirksam gegenüber *Bacillus cereus*, *Branhamella catharrhalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Cryptococcus*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Lactobacterium*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium africanum*, *avium*, *bovis*, *flavescens*, *fortuitum*, *gordanae*, *kansasii*, *terrae* and *xenopis*, *Neisseria meningitidis*, *Nocardia*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *millerie*, *pneumoniae* and *viridans* and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus pyogenes*, *Trichomonas vaginalis* and *Vibrio cholerae* charakterisiert.

# DE 195 15 891 A1

## Sequenzprotokoll

### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

#### (i) ANMELDER:

(A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH

(B) STRASSE: Sandhoferstr.116

(C) ORT: Mannheim

(E) LAND: DE

(F) POSTLEITZAHL: 68305

(G) TELEFON: 0621 759 4348

(H) TELEFAX: 0621 759 4457

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Gattungs- und speziesspezifische Identifizierung von Legionellen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68

#### (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

### (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

#### (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "Konsensussequenz"

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCAA 60  
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
ATATAATCTG AGTGAATTCA GATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAC GTATCGTOTA 180  
AAGTCGACT CTTTACCBA CCTGTGCTT AATATAGCA TCAAGCCCTC ACGTAAACCA 240

GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAGTCA 300  
 AACATTTCOS CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTCTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 18 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

20

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

30

GGCTGATTGT CTTGACCA

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

35

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

40

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

45

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

50

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

55

AGGAGCCTC ACACTATCAT

20

60

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

65

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	5
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure	
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"	
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	10
(iv) ANTISENSE: JA	
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:	
(A) ORGANISMUS: Legionella	15
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:	
CTTGAAGACT ACGAGCTTCA TAGG	24 20
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:	
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	25
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	30
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure	
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"	35
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	
(iv) ANTISENSE: JA	
(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:	40
(A) ORGANISMUS: Legionella	
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:	45
AATGTTTCAC TTCTGAGTTC G	21
(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:	50
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:	
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare	
(B) ART: Nucleotid	55
(C) STRANGFORM: Einzelstrang	
(D) TOPOLOGIE: linear	
(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure	60
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"	
(iii) HYPOTHETISCH: NEIN	
(iv) ANTISENSE: JA	65

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AACCACCTGA TACCATCTCG AACTCAGAA

29

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

15

(A) LÄNGE: 30 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

20

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

25

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

30

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

35

ACCTGAAAGC TATCGGTAA ACTGTGCTC

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

40

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

45

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

50

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella anisa

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

60

ATGCCAATAC AAGATGTAGG TTGGCC

26

65

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 34 Basenpaare 5

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear 10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN 15

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei 20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

ATGTAAATTG CTCAGACAAA TGAATACAGA GTTT 34 25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare 30

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang 35

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide" 40

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: 45

(A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

CCCTTTTTT CAGAGCACTT AACATGCTC T 31 50

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 29 Basenpaare 55

(B) ART: Nucleotid 60

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear 65

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotida"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella cherrii
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

15 AATGCAAATA CAGAAATTT AGGTCGGC

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotida"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella cincinnatiensis
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

40 CTCTCTTTT TTACCGGAAG TAACGGC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotida"
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iv) ANTISENSE: JA
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: Legionella dumoffii
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

ATCAATACCT GGGGTAGGAC ACCTGC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

5

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

10

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

15

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

20

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella erythra

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

25

AACCCCGCTA AGACCGGAAA AACC

24

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

35

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

40

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

45

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feeleii

50

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GCAAAAATGA AAGACAAATG CCTTTGT

27

55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

60

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

65



(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella israelensis

(xi) SEQUENZENBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

TTAAGCGCTT GTGAATCAAA CCCATTC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella jordanis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

TGATCAATGA ATATCCCTTA ACATCGG

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella longbeachae*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

5

TGCTTGATAT AAGATATAAT ACCTCTTTAT TTACCTGAG

39

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 32 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

25

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella maceacharnii*

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

GGCAATACCT TAATTAAAGG CATTATGCC TA

32 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

40

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

45

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

50

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

55

(A) ORGANISMUS: *Legionella moravica*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

60

AGGCCTTGGG CTTGTTGATT GAA

23

65

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 40 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

GTGCTGATA TAAGATATAA TTTACTCTC TTTATTACC

40

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "DNA-Oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: JA

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella spiritensis

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

GTGTGCCCCG AAGAGAAAC AGGGT

25

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 28 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

TTGTACTAAT TGGCTGATTG TCTTGACCAT A

31

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 (B) STAMM: Philadelphia-1  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: Olphila

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA      60
GGTGTGGAAG CGCGATATG CGTGAACCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTAACCTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCGTGTGTA      180
AACTCTGACT CTTTACCAA CCGTGGCTT AATAAGCAA TCRAAGCCTC AGGTAAACCA      240
GTTTCCCTGG CGACTATAGC GATTTGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA      300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC      336

```

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 336 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 (B) STAMM: Knoxville-1  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: O2knox

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA      60

```

# DE 195 15 891 A1

GGTGTGGAG CGCACTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTGTGA TACGTGAAAC GTATCGTGTGTA	180
AACCTGCACT CTTTACCATA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGCTAAACCA	240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA	300
AACATTTCGG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Benidorm 030E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 04beni

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACCT TGATAGGCAA	60
GGTGTGGAG CGCACTAATG CGTGAAGCTA ACTTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTGTGA TACGTGAAAC GTATCGTGTGTA	180
AACCTGCACT CTTTACCATA CCTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAAGCCTC AGCTAAACCA	240
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAAGTGA	300
AACATTTCGG CGCCATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

50

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

60

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: France 5811

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 05fran

65

## (x1) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAG CCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA 60  
 GGTGTGGAAG CCGAGTAATG CCGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGT 180  
 AACTCTGACT CTTTACCAAM CCGTGGCTT AATAAGCAA TYAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 10 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTCA 300  
 AACATTTCGG CGCCAATCAT AGTGTGAGGC TTCTC 336

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 20 (A) LÄNGE: 336 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 25 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 30 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila  
 (B) STAMM: OLDA  
 35 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 060lda

## (x1) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

40 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAGG HHCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA 60  
 GGTGTGGAAG CCGAGTAATG CCGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTACTTCA GATTATGATA TTGATTGTA TACGTGAAGC GTATCGTGT 180  
 45 AACTCTGACT CTTTACCAAA CCGTGGCTT AACAYAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAATCCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTCA 300  
 AACATTTCGG CGCCAATCAT AGTGTGAGGC TTCTC 336

50

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 55 (A) LÄNGE: 335 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 60 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

65

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Oxford 4032E

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 07oxfo

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN HNCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA	60	
GCTGTGGAGG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATT TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTCTA	180	15
AACTCTGACT CTTTACCATA CSTGTGGCTT AATAATGCAA TCAAGCCTCA GGTAAACCAG	240	
TTTTCTGGC GACTATAGCG ATTGGGAACC ACCTGATACC ATCTCGAACT CAGAGTCTAA	300	
ACATTTCCGC GCCAATGATA GTGTGAGGCT TCCTC	335	20

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Campdown-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: O8Camp

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA	60	
GCTGTGGAGG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTTGTA TACGTGAAAC GTATCGTCTA	180	50
AACTCTGACT CTTTACCATA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAGCCTC AGCTAATCCA	240	
CTTTCTGGC GACTATAGCG GATTGGAAC CACCTGATAC CATCTCBAAC TCAGAGTCTA	300	
AACATTTCCG GCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336	55

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Togus-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 09tog

(xi) SEQUENZESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TCATAGCCAA	60
GCTGTGGAG CGCAGTAATG CCGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACCTGATAA GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TAAAGCCTC AGGTAACCA	240
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGGAC CACCTGATAC CATCTGGAAC TCAGAGTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTCT	336

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Bloomington-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 10Bloom

(xi) SEQUENZESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TCATAGCCAA	60
GCTGTGGAG CGCAGTAATG CCGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTTGTA TACCTGATAA GTATCGTGTA	180
AACTCTGACT CTTTACCAAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TAAAGCCTC AGGTAACCA	240
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTGGGAC CACCTGATAC CATCTGGAAC TCAGAGTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTCT	336



## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare 5

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear 10

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: 15

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Los Angeles-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 11sg41a 20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NHCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA	60	25
GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTGTA	180	
AACTCCGACT CTTTACCAA CCGTGGCCTT AATAGTGATA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240	30
GTTCCTCGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACGTGATAC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA	300	
AACATTTCCG CCCCATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336	

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare 40

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear 45

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT: 50

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Portland

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 12sg4po 55

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA	60	60
GGTGTGGGAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGAATTGTA TACGTGATAM GTATCGTGTA	180	
AACTCTGACT CTTTACCAA CCGTGGCCTT AATGAAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA	240	65

GTTTCCTCG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA 300  
 AACATTTCCG CCGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC 336

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

20

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Dallas-1E

25

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 13sg5da

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 37:

30 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA 60  
 GGTGTGGGAG CCGAGTAATG YGTGAAGCTA ACTGTACTTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTATAA TTGAATTGAA TACGTACAAC GCATCGTCTA 180  
 35 AACTCCGACT CTTTACCAA CCGTGGCTT AATAGTGTA TCAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTCCTCGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA 300  
 AACATTTCCG CCGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTTC 336

40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Cambridge-2

60

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 14sg5cam

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 38:

65 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA 60

GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGAAAC GTATCTGTGTA	180
AACCTGTGACT GTTTACCAA CCTGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336

10

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 39:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

15

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

25

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 15sg6ch

30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 39:

CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN NNCCTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60	35
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATATGATA TTGATTGTA TACCTGATAM GTATCTGTGTA	180	
AACCTGTGACT GTTTACCAA CCTGTGGCTT AATAAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	40
GTTCCTCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300	
AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336	

45

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 40:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

50

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

55

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

60

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: Chicago-8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 16sg7

65

## (xi) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 40:

5 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA 60  
 GGTGTGGAAG GCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAGC GTATCGTCTA 180  
 10 AACTCTGACT CTTTACCATA CCGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGGAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA 300  
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGA CTCCTC 336

15

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 41:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

20

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANZFORM: Einzelstrang

25

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

30

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*

(B) STAMM: Concord-3

35

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 17sg8

## (xi) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 41:

40 GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TOCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA 60  
 GGTGTGGAAG GCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAGC GTATCGTCTA 180  
 45 AACTCTGACT CTTTACCATA CCGTGGCTT AATAAGCAA GAAAAGCCTC AGGTAAACCA 240  
 GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTGGGAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA 300  
 AACATTTCCG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT CTCCTC 336

50

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 42:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

55

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANZFORM: Einzelstrang

60

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

65

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*

(B) STAMM: IN-23-G1-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 18sq9

## (xi) SEQUENZIESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 42:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN HCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60	10
GCTGTGGAAG CGCAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180	15
AACCTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AACATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA	240	
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300	
AACATTTCOG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336	20

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 43:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella pneumophila*

(B) STAMM: Leiden-1

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 19sq10

## (xi) SEQUENZIESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 43:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGANN HCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA	60	45
GCTGTGGAAG CGCAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	
ATATAATCTG AGTGACTTCA GATTATGATA TTGATTGTGTA TACGTGAAAC GTATCGTGTA	180	50
AACCTCTGACT CTTTACCAA CCTGTGGCTT AATATAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAATCCA	240	
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300	
AACATTTCOG CGCCAATGAT AGTGTGAGGC TTCCTC	336	55

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 44:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 797-PA-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 20sg11

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 44:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA      60
GGTGTGGAAG CCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTGAATTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGAAC GTATCGTGA      180
AACTCTGACT CTTTACCAG CCGTGGCTT AATAAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA      240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATC CATCTGAAC TCAGAACTGA      300
AACATTTCGG CGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC      336

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 45:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: S70-CO-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 21sg12

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 45:

```

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGNNN NNCNNGCAAG ACTACGACGT TGATAGGCCAA      60
GGTGTGGAAG CCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTAATTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACCTGATN GTATCGTGA      180
AACTCTGACT CTTTACCAG CCGTGGCTT AATAAGCAA TCAAGCCTC AGGTAAACCA      240
GTTTCTCTGG CGACTATAGC GATTGGAAC CACCTGATC CATCTGAAC TCAGAACTGA      300
AACATTTCGG CGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC      336

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 46:

## (1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 82-A-3105

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 22sq13

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 46:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60	
CGTGTGGAG CCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	25
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCCTGTA	180	
AACCTGACT CTTTACCAA CCGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300	30
AACATTTCCTG CCGCAATGAT AGTGTGAGGC TTCTC	336	

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 47:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 336 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella pneumophila

(B) STAMM: 1169-MM-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 23sq14

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 47:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGC	60	
CGTGTGGAG CCGAGTAATG CCGTAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	60
ATATAATCTG AGTGACTTCA GAATGTGATA TTGATTGTA TACGTGAAAC GTATCCTGTA	180	
AACCTGACT CTTTACCAA CCGTGGCTT AATACAGCAA TCAAAGCCTC AGGTAAACCA	240	
GTTTTCCTGG CGACTATAGC GATTTCGAAC CACCTGATAC CATCTCGAAC TCAGAACTGA	300	65

AACATTTCGG CGCCATGAT AGTGTGAGCC TTCTC

336

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 48:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 374 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella anisa
- (B) STAMM: WA-316-C2
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 24ani

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 48:

GAAGCCTCCC	TCAAGATGAG	TTTCCCATG	AAGCCCGTTG	AAGACTACCA	CCTTGATAGG	60
CAAGGTGTGG	AAGCACGTA	ATGTGTGAG	CTAAGTGTGTA	CTAATTGGCT	GATTGTCTTG	120
ACCATATAAT	CTGAGTTACT	TCAGATTGTG	AATGCCAATA	CAAGATGTAG	GTTCGGCCCA	180
GGCTCAACCT	ACGCAGAACT	ACTGCAACA	AMGTGTGAG	TTCTTTATT	ACCTAATGCT	240
TGATTGAGGT	ATAATGCCCT	ACAATCAATG	CAAAACCACT	TTTCCTGGCG	ACCATAGCGG	300
TTTCGAACCA	CCTGAATCCA	TCCTGAAGTC	AGAACTGAAA	CGAACCCCGG	CCATGATAG	360
TGTGAGGTTT	CCTC					374

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 49:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 350 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Legionella brunensis

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 49:

GCCTCCCTCA	AGATGAGTTT	TCCATCAAG	CCCGTTGAAG	ACTACGACCT	TGATAGGCGA	60
GGTGTGGAAG	CCGAGTAAG	TGTGAAGCTA	ACTCGTACTA	ATTGGCTGAT	TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG	AATGACTTCG	GCTTATGATA	GAAGATGATA	GATTATCCCG	TAAGCCACTT	180



GTGTTAACCC TTTTCTACTT TACCAGCCTG TTTTACAGA GCACTTAACA ATGCTCTTAA	240
TCAACAGGAC AACAGTTTTC CTGGCGACCA TAGCGGTTTG GAACCACCTG ACTCCATCTC	300
GAACTCAGTA GTGAAACAGA CCAGCGCCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC	350

5

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 50:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

10

(A) LÄNGE: 317 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

20

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella cincinnatiensis*

(B) STAMM: 72-OH-H

25

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 29ein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 50:

30

GCCTCCCTCA AGCTGAGTTT TCCCTTGAAG CCGGTTGAAG ACTACACCTT TGATAGCCAA	60
GGTGTGGAAG CCGTAGTAAT CCGTAAGCTA ACTGTACTTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AGTTACTTCA GAGTGAAACA GAATATAAGT GACACCATGA CTCTCTTTT	180
TTACCGGAAG TAACGGCTCT CAGCGCGCGC TACTCAAAAC ACTTTTCCTG CCGACCATAG	240
CGGTTTGGAA CCACCTGATT CCATCTCGAA CTCAGTAGTG AAACGAACAT GCGCCCAATG	300
TAGTGTGAGG TTTCCTC	317

40

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 51:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45

(A) LÄNGE: 359 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella dumoffii*

(B) STAMM: NY-23

60

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 31DUM0

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 51:

65

GCGTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGGAG ACTACGACGT TGATAGGCCA 60  
 GGTGTGGAG GCGAGTAATG CGTGCAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTTACTTCA GATGACTCA ATCAATACCT GCGGTAGGAC ACCTGCCCCG 180  
 AAATAAATAC AAAATAGTGT GTCTCTTTA TTTACCTCGT GCATGATTGG GGTATAATAT 240  
 GCGCAATGA TCACTGCAA CCAGTTTCC TCGGACCAT AGCGGTTTGG AACCACCTGA 300  
 ATCCATCTCG AACTCAGAAG TGAACGAC ATCGGCTAAT GATAGTGTGA GCGTTCCTC 359

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 52:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 362 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella charii

(B) STAMM: ONW

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 30cha

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 52:

GCGTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA 60  
 GGTGTGGAG CACAGTAATG TGTGCAGCTA ACTTGACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC 120  
 ATATAATCTG AATTACTTCA GATTAAGTCA ATCAATATAC AAGCAATTTA GGTGCGGCCA 180  
 CGGCCCCATC TCGAAAAA ATGTGTACTC TTTATTACCT TAACGCATGA TTCGGGTATA 240  
 ATCGCGCCAT TAATCATGTT AACCAGTTT TCTCGCCGAC CATAGCGGTT TCGAACCACC 300  
 TCACTCCATC TCGAAGTCAG AAGTGAAGCG AACCGCGGCC AATGATAGTG TGAGGTTTCC 360  
 TC 362

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 53:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 325 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella erythra

(B) STAMM: SE-32A-C8

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 32ERY

(xi) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 53:

5

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCGA	60	
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACT	120	10
ATATAACCTG ATGCGCTTCA GGTATATGG ATAACATGAA TGTGACTCTA TTTTATCCG	180	
GCCTCGTGGC CAACCCGGGT AAGACCGGAA AAACCATGAT GCTTAAACCG TTTTCTGGC	240	
GACCATAGCA GTTTGGAACC ACCTGAATCC ATCTCGAATC CAGAAGTGAA ACAGACTCGC	300	15
CCCGATGATA GTCTGAGGCT TCCTC	325	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 54:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 342 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

25

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella feelei

35

(B) STAMM: WO-44C

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 33feal

(xi) SEQUENZENSCHREIBUNG: SEQ ID NO: 54:

40

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCGA	60	
GGTGTGGAAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	45
ATATAACCTG AATTGCTTTG AGTTTATAGC CAAAATGAA AGACAAATGC GTTTGTGTTA	180	
CCTCATAATC TTTACCGGCC TGTGGCTGA GCACTTAACC CTGCTTTATC CAGACAGGC	240	
AAACCCGTTT TCGTGGGAG CATAGCGTT TGAACACAC TGAATCCATC TCGAATCAG	300	50
AAGTGAACA AACCCTGGCC GATGATAGT TGAAGTTTCT CC	342	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 55:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 349 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

60

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

65

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella feeleii*

(B) STAMM: 691-WI-H

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 34feel

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 55:

60	GCCTGAGCC TCCCTCAGA TGAGTTTTC CATGAGCCC GTTGAGACT ACCAGCTTCA	60
120	TAGCGAGGT GTGGAAGCC AGTAATGCT GAAGCTAAT CTTACTAAT GCCTGATTGT	120
180	CTTACCATTA TAACCTGAAT TGCTTTGAGG TTATAGGCAA AAATGAAGA CAAATGCCCT	180
240	TGTGTTACCT CATAATCTTT ACCGCGCTTC TGCGTGAACA CTTAAACCTG CTTTATCCAG	240
300	AACAGGCAA CCGTTTTTC TGGGACCAT AGCGTTTTC AACCACTGA CTCCATCTCG	300
349	AACTCAGAAG TGAACAAAC CCGGCGCAT GATAGTGTGG AGTTTCTCC	349

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 321 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella israelensis*

(B) STAMM: Barcovier-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 36ier

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 56:

60	GCCTTCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCGTTTGAAG AGAGGAGCT TGATAGGCGA	60
120	GGTGTGGAG CCGAGTAATG TGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTGACC	120
180	ATATATCTCG AAATCATTC GGGCATGATA CAAATGAGT TTAAAGGCTT GTGAATCAA	180
240	CCATTCAAT CTTTACCTTC TGCTTCAAT AAGGCAAGAT AACCGTTTT CTTGGGAGC	240
300	ATAGCTGTTT GGTACCACT GATACCTTC CCACTCACT AGTGAACAA ACACCGCTG	300
321	ATGATAGTGT GCGGTCTCCC C	321

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 348 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 5
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Legionella jordanis 10
- (B) STAMM: BL-540
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 38jor
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 57: 15

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60	
GGTGTGGAAG CCGAGTAATG TGTGAACCTA ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	20
ATATAACCTG AATGGCTTTT ATGTGCCAAG TCAAGACAA GCGTTGGCAA GCTTGTGTTG	180	
CCCTAATATT TATGTTTACC AGCGTGATGA ATGAATATCC CCTAACATGG GTATTTGCTC	240	
AGCAGGACAA CTTTTTCCT GCGACCATTA CCGGTTTGGG ACCACCTGAC TCCATCTCGA	300	25
ACTCAGAAGT GAAACAGACC AGCGCCGATG ATAGTGTGAG GCTTCCTC	348	

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 58: 30
- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 312 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid 35
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 40
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Legionella longbeachae sero.1 45
- (B) STAMM: Long Beach-4
- (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 39long1
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 58: 50

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA	60	
GGTGTGGAAG CCGAGTAATG CCGTGAACCTA ACTGCTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	55
ATATAATCTG AGTTACTTCA GATTATGCTT GATATAAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC	180	
TGAGTATCAT GCCAATAATG CCGGATACTC AAAACAGTTT TCGTGGCGAC TATACGGGTT	240	
TGGAACCAAC TGAATCATC TCGAACTCAG AAGTGAACG TACATCGGCC AATGATAGTC	300	60
TGAGGCTTCC TC	312	

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 59:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 312 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella lonbeachae* sero.2  
 (B) STAMM: Tucker-1  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 40long2

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 59:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCAA 60  
 GGTGTGGAAG CGTAGTAATG COTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTTACTTTA GATTATGCTT GATATAGAT ATAATACCTC TTTATTTACC 180  
 TGAGTATCAT GCCAATAATG CCGGATACTC AAAACAGTTT TCCTGGCGAC TATAGCGGTT 240  
 TGGAACCCAC TGAATCCATC TCGAAGCTAG AAGTGAACG AACATGCGCC AATGATAGTG 300  
 TGAGGCTTCC TC 312

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 60:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 354 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: *Legionella machisearcherii*  
 (B) STAMM: FX-1-G2-E2  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 41mac

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 60:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCGA 60  
 GGTGTGGAAG CACAGTAATG TGTGTAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAACCTG AGCTGCTTTT AGCTTGAAGA GTAGTGATA AGCCAATACT TTAATTAAAG 180  
 GCATTAATGC CTAGCGTTT GTGTTAAGCT CTACCGCTT TACCAAGGTG ATTGGCGAAT 240

AGGCCAATCG GTAAACCACT TTTCTGGCG ACCATAGCGG TTTGGAACCA CCGAATCCA 300  
TCTCGAATC AGAAGTGAAA CAGACCTGCG CCAATGATAG TGTGGGGCTT CCCC 354

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 374 Basenpaare

10

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

20

(A) ORGANISMUS: Legionella micdadei

(B) STAMM: Tatlock

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 42micd

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 61:

GAAGCCTCCG TCAAGATGAG TTTCCCATG AAGCCCGTTG AAGACTACGA CATTGATAGG 60 30  
CGAGGTCTGG AAGCACGTA ATGTGTGTAG CTAACTCGTA CTAATTGGCT GATTGTCTTG 120  
ACCATATAAC CTGAATGCG TTTAGTTAT GAGTGAGCA GCAAGGCAAT ATTGAATGAC 180  
AGGGCAATGT AATTGCTCA GACAAATGAA TACAGAGTTT GTGTTAACCT CTATCCACTT 240 35  
TACCAAGCTG ATTGGTTAAT AGCCCAATCG GTAAACCAGG TTTCTGGCG ACTATAGCGG 300  
TTTGGAAACCA CCGAATCCA TCTCGAATC AGAAGTGAAA CAGACCTGCG CCAATGATAG 360  
TGTGGGGCTT CCCC 374 40

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

45

(A) LÄNGE: 340 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

50

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

55

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella moravica

(B) STAMM: 316-36

60

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 43mour

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 62:

65

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCCA 60  
 GGTGTGGAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC 120  
 ATATAATCTG AGTTACTTCG GGTATAGAA GTAGACGATA AAATAGAGTA GATGTGTTA 180  
 CCTCGAATCT TTACCAGGCC TTGGGCTTGT TGATGAACH CAATCATCAA TCTGAAGCTA 240  
 AACAGTTTTC CTGCGACAA TAGCGGTTTG GAACCACTG ATCCCATCTC GAATCAGAA 300  
 GTGAACGAA CATCGCGCGA TGATAGTGTG AGGCTTCCTC 340

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 63:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 302 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: *Legionella oakridgensis*
    - (B) STAMM: OR-10
    - (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 44oak
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 63:

AGCTCCCTC GAGATGAGTT TTCCATGAA CCCGTTGAA GACGACGAC TGATAGGCC 60  
 AGGTGTGGAA CGTAGTAAT AGTGAAGCT AACTGTACT AATTGGCTGA TTGTCTTGAC 120  
 CATATAACCT GAGTTGATTC AGGTAACGC ATGGCTTTGT GTATCCCTCA ATCATTACCA 180  
 CTTGGAGGCG TAAGCTTCCA ATACGTTTT TCTGGCGAC CATACCGCTT TCGAACCC 240  
 TGATACGATC CGCAACTCAG AAGTGAACH AACCGCGCG AATGATAGTG TGGGCTTCC 300  
 CC 302

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 64:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 323 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
  - (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
    - (A) ORGANISMUS: *Legionella rubrilucens*



(B) STAMM: WA-270A-C2

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 45rub

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 64:

5

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60	
GGTGTGGAAG CGCAGTAATG CGTGAAGCTA ACTGGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	10
ATATAACCTG ATACGCTTCA GGTATAGCA ATACATGAA TGTACTCTA TTTTTCACG	180	
GCCTCATGGC CAGCGTTAA CACCGTTGCC ACCATGACGC TTAACCGTT TTCTGGCGA	240	
CCATAGCAAT CTGGAACCAC CTGAATCCAT CTCGAAGTCA GAAGTGAAC AGACTCGCGC	300	15
CGATGATAGT GTGAGGTTTC CTC	323	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 65:

20

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 316 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

25

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

30

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Legionella sainthelensis

35

(B) STAMM: Mt.St. Helens-4

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 46saint

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 65:

40

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGGCGA	60	
GGTGTGGAAG CGTACTAATG CGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120	45
ATATAATCTG AGTTACTTCA GATTGTCTG AATATAAGAT ATAATGTTAC TCTCTTATT	180	
TACCTGAGTA TCATCGCGCT AATGCACGAT ACTCAAACA GTTTTCCTGG CGACCATAGC	240	
GGTTTGCTAC CACGTGATTC CATCTGGAAC TCAGAAGTCA AACGAACATG CGCCAATGAT	300	50
AGTGTGAGGC TTCTCT	316	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 66:

55

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 350 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

60

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

65

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella spiritensis*

(B) STAMM: Mt. St. Helens-9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 47spir

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 66:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCGA	60
GGTGTGGGAG CGTAGTAATG CGTGAAGCTM ACTCGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAACCTG AATGACTTCG GGTATTGAT ACGAAGATA CGAAAGAAG CAGGACCGAT	180
TGTGTTACCG AATATCTCTT TACCAGCGTG TGGTGTGCCG TGAAGAAGAA ACAGCGTTAC	240
CATTCAGGAT AACCGTTTTG CTGGCGATTA TAGCCGTGTG GAACCACTG ATTCCATCTC	300
GAACTCAGAA GTGAACCCCA CGTACCGCGA TGATAGTGTG GGGTCTCCCC	350

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 67:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 360 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Legionella steigerwaltii*

(B) STAMM: SC-18-C9

(C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 48steig

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 67:

GCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCATGAAG CCCGTTGAAG ACTACGACGT TGATAGCCGA	60
GGTGTGGGAG CGCAGTAATG TGTGAAGCTA ACTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC	120
ATATAATCTG AATTACTTCA GAGTGACTCA ATGTGTATAG AAGCTGTAGG TTGGCCACCG	180
CACACCTTAC AGAATATAAT TGTGAACCGT TTATTACCT AATGCATGAT TCGGCTATAA	240
TACGCCCAAC ATCATGTAAA ACCAGTTTTG CTGGCGACCA TAGCGTTTG GAACCACTG	300
ACTCCATCTC GAACTCAGAA GTGAACAGAA CCGCGGCGAA TGATAGTGTG AGGTTTCCTC	360

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 68:

(1) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 366 Basenpaare

(B) ART: Nucleotid

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang  
 (D) TOPOLOGIE: linear  
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA 5  
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN  
 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:  
 (A) ORGANISMUS: *Legionella wadsworthii* 10  
 (B) STAMM: 81-716A  
 (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: 49wad  
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 68: 15

```

CCCTCCCTCA AGATGAGTTT TCCCTTGAAG CCGCTTGAAG ACTACGACCT TGATAGGCRA      60
GGTGTGGAAG CCGAGTAATG TGTGAAGCTA ACTTGTACTA ATTGGCTGAT TGTCTTGACC      120
ATATAATCTG AGTTACTTCA GGTTRACTGA TAAGTACCTA CGAATTAGAG ATTGGGTCTA      180
GGCCCAATCT AAAAAAATA AAAAAATGTG AACCTTTTTA TTACCTATA GCATGATTAG      240
GGTATAATAC GCCCAATTCA TCGGAAACCA GTTTTCCTGG CGACRATAGC GGCTTGGAAC      300
CACCTGATCC CATCTCGAAC TCAGAAGTGA AACGAGCATG CGCCAATGAT AGTGTGAGGT      360
CTCCTC

```

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella*, dadurch gekennzeichnet, daß mit weniger als 7 Primern Nukleinsäuren aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* amplifiziert werden. 35
2. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella*, dadurch gekennzeichnet, daß Nukleinsäuren aller möglichen Spezies einer Gattung *Legionella* in einem Amplifikationsverfahren unter Verwendung von weniger als 7 Primern amplifiziert werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Spezies aufgrund der unterschiedlichen Größe der Amplifikate differenziert wird. 40
4. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit einer gattungsspezifischen Sonde nachgewiesen werden.
5. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe speziesspezifischer Sonden auf die Anwesenheit von *Legionella*-Spezies untersucht werden.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikate anschließend mit Hilfe von *Legionella*-Untergruppen spezifischer Sonden auf die Anwesenheit von *Legionella*-Untergruppen untersucht werden. 45
7. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter Amplifikation eines Teilstückes der Nukleinsäuresequenz der Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß das Teilstück sowohl Teile der 23S-Region und der 5S-Region, als auch die dazwischen liegende Spacerregion umfaßt. 50
8. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Amplifikation unter Verwendung zweier Primer durchgeführt wird, von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region hybridisiert.
9. Verfahren gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Primersequenzen Sequenzen enthalten, die ausgewählt sind aus mindestens 15 Basen langen Sequenzen, die zumindestens 90% homolog mit oder komplementär zu Teilsequenzen der SEQ.ID.No. 1 sind. 55
10. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* unter Verwendung einer Nukleinsäuresonde, welche eine mindestens 15 Basen lange Sequenz aufweist, die zumindest 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist, oder die zumindestens 90% komplementär zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist.
11. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde keine weiteren *Legionella*-spezifischen Sequenzen aufweist, die mehr als 15 Basen lang sind. 60
12. Verfahren gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß vor Verwendung der Nukleinsäuresonde ein Amplifikationsverfahren gemäß Anspruch 9 durchgeführt wird und die Sonde mit einem Strang des amplifizierten Teilstückes hybridisieren kann.
13. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella*, dadurch gekennzeichnet, daß die Summe aller möglichen Spezies der Gattung *Legionella* nachgewiesen wird. 65
14. Nukleinsäuresonde zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella*, welche zu mindestens 90% homolog zu einem Teil der SEQ.ID.No. 1 ist, oder die zu mindestens 90% komplementär zu einem Teil der

SEQ.ID.No. 1 ist.

15. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß sie gattungsspezifisch ist.

16. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Teil von SEQ.ID.No. 1 zwischen den Positionen 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 oder 307 und 286 liegt.

5 17. Sonde gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz der Sonde die Sequenz von Position 94 und 126, 25 und 67, 336 und 293 oder 307 und 286 einschließt.

18. Paar von Primern zur Amplifikation von Legionella-Nukleinsäuren von denen einer mit einem Strang in der 23S-Region und der andere mit dem Gegenstrang in der 5S-Region des Legionella-Genoms hybridisiert.

19. Doppelsträngige Legionella-spezifische Nukleinsäure enthaltend die Spacerregion zwischen 5S-RNS und 23S-RNS sowie jeweils nur solche Teile der 5S-RNS und 23S-RNS, die im Genom direkt an die  
10 Spacerregion anschließen.

20. Nukleinsäure gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie höchstens 371 bp lang ist.

21. Reagenzkit zum Nachweis von Legionella-Spezies enthaltend

- mindestens eine Legionella-gattungsspezifische Nukleinsäure und
- 15 — mindestens eine Legionella-speziespezifische Sonde.

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

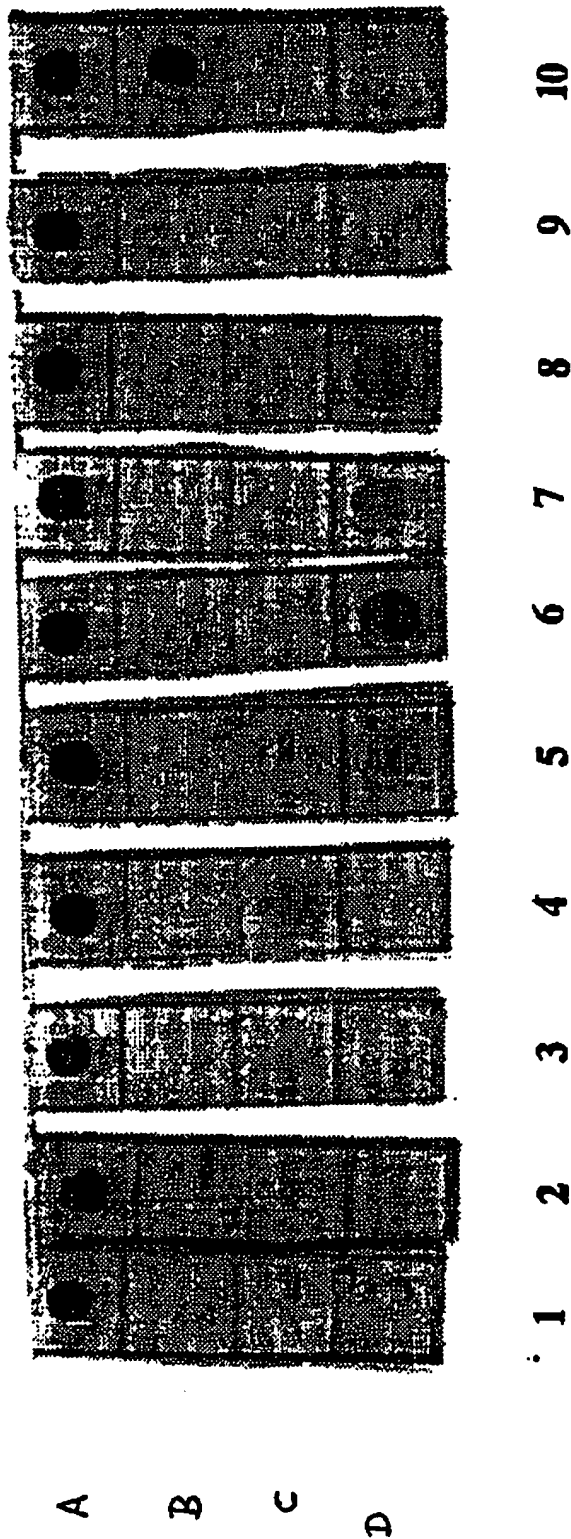
- Leerseite -

Fig. 1

1: GCCTCCCTCAAGATGAGTTTTCCCATGAAGCCCGTTGAAGACTACGACGT  
 51: TGATAGGCAAGGTGTGGAAGCGCAGTAATGCGTGAAGCTAACTTGTACTA  
 23S/Spacer  
 101: ATTGGCTGATTGTCTTGACCATATAATCTGAGTGACTTCAGAA/TGTGATA  
 151: TTGATTTGTATACGTGAAACGTATCGTGTAAGCTCTGACTCTTTACCAAA  
 Spacer/5S  
 201: CCTGTGGCTTAATATAGCAATCAAAGCCTCAGGTAAACCAGTTT/TCCTGG  
 251: CGACTATAGCGATTTGGAACCACCTGATACCATCTCGAACTCAGAAGTGA  
 301: AACATTTCCGCGCCAATGATAGTGTGAGGCTTCCTC

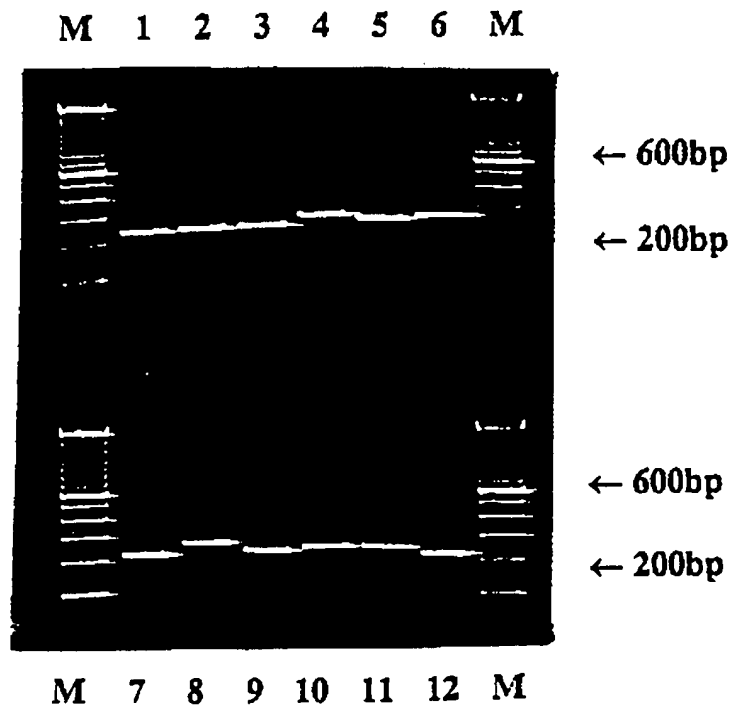
BEST AVAILABLE COPY

FIG 2



BEST AVAILABLE COPY

FIG 3





BEST AVAILABLE COPY

FIG 4

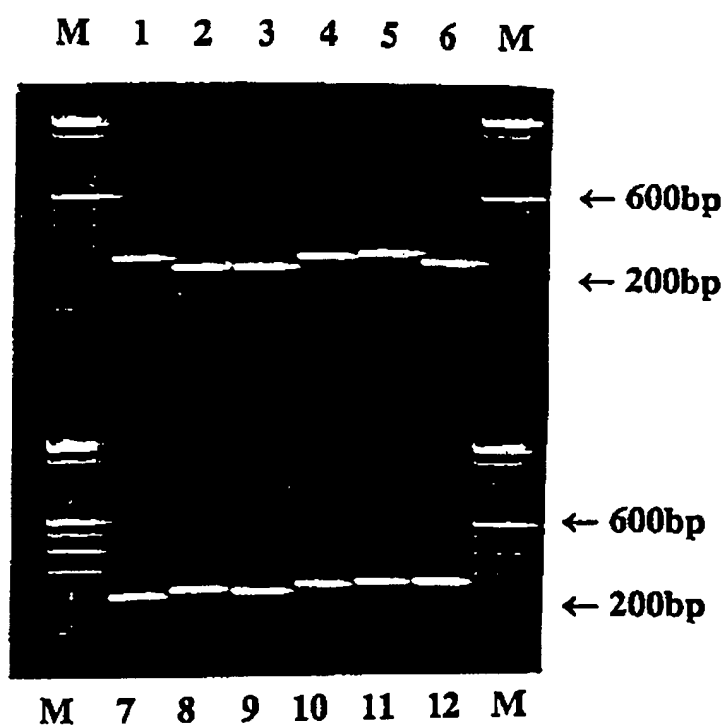


FIG 5

BEST AVAILABLE COPY

